

蛋白质二硫键异构酶——一种可能参与蛋白质生物合成的酶

唐 建 国

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100080)

提 要

蛋白质二硫键异构酶分布很广, 种属间比较保守, 定位于内质网膜上, 组织分布、活力水平与含二硫键的蛋白质的合成平行, 而且底物专一性很差, 催化巯基二硫键交换, 提示它可能参与蛋白质的生物合成。

关键词 蛋白质二硫键异构酶, 蛋白质生物合成, 巯基二硫键交换

二硫键的形成是蛋白质生物合成中后加工的关键步骤之一, 尽管蛋白质分子中的二硫键早已为人所知, 但对二硫键在蛋白质生物合成中的形成机制至今了解甚少。

在相当长的时间里, 关于二硫键形成的许多工作是用蛋白质化学的研究方法来进行的, 即通过对蛋白质分子的折叠中所形成的二硫键中间物的研究来观察二硫键的形成。这虽然与

生物体内的过程有差距, 但这一工作是很富有成果的。60 年代初, Anfinsen 及其同事从他们的经典工作: 即一条肽链的蛋白质分子, 如核糖核酸酶, 在变性剂中还原, 去除变性剂和还原剂后, 能以较高的产率形成天然二硫键, 恢复其天然的构象和活力, 提出了蛋白质分子的高级结构是由其一级结构决定的, 二硫键并不包含结构信息的观点^[1]。1973 年, Wetlaufer 等^[2]用

高^[3]。以此为标志, 表明蛋白质分子的头头设计已跨越了第一个里程碑。目前, 在设计的蛋白质中引入活性的研究也已展开。这一方面的深入发展, 必将对未来的生物学和新一代生物技术的开拓产生深刻影响。

(4) 以蛋白质为靶的药物设计。这是有重要应用前景的研究课题, 为科学界和实业界共同重视, 一些公司予以巨额投资。目前, 围绕着抗病毒(如感冒病毒, 爱滋病毒)药物的设计, 开展着大量的活跃研究。

参 考 文 献

- 1 Protein Data Bank Newsletter, 1990; No. 52
- 2 Protein Data Bank Newsletter, 1989; No. 52
- 3 Deisenhofer J et al. Nature, 1985; 318: 618
- 4 Deisenhofer J, Michel H. Science, 1989; 245: 1463
- 5 Rossmann M G et al. Nature, 1985; 317: 145
- 6 Palmenberg A. Nature, 1987; 392: 668
- 7 Alper J. Science, 1990; 247: 804
- 8 Amit A G et al. Science, 1987; 233: 747
- 9 Bjorkman, P J et al. Nature, 1987; 329: 506
- 10 Rould M A et al. Science, 1989; 246: 1135
- 11 Brennan R G, Matthews B W. TIBS, 1989; 7: 286
- 12 Cox M J, Weber P C. J Appl Crystallogr, 1987; 20: 366
- 13 Schlichting I et al. Nature, 1990; 345: 309
- 14 Wright, P. TIBS, 1989; 7: 255
- 15 Oschkinat H et al. Nature, 1988; 332: 374
- 16 Fesik S W et al. Biochem Biophys Res Commun, 1989; 159: 842
- 17 Tsang P et al. Peptide Research, 1988; 1: 87
- 18 Struhl K. TIBS, 1989; 7: 137
- 19 Chen Z et al. Science, 1989; 245: 154
- 20 Yonath A, Wittmann G. TIBS, 1989; 8: 339
- 21 Staley J P, Kim P S. Nature, 1990; 344: 685
- 22 Rothman J E. Cell, 1989; 59: 591
- 23 Ellis R J et al. TIBS, 1989; 8: 339
- 24 Fasman G D. TIBS, 1990; 7: 295
- 25 Kim P S. Protein Eng, 1989; 2: 249

【本文于1990年9月17日收到, 12月15日修回】

二硫键化合物(而不是 Anfinsen 等用的空气氧)确定了蛋白质二硫键的形成是通过一系列的巯基二硫键交换进行的。1978年, Creighton^[3]分离了含三对二硫键的牛胰凝乳蛋白酶抑制剂的分子折叠过程中含错接二硫键的中间产物,对折叠过程做了动力学和热力学的描述,认为折叠中有动力学促进的途径,但正确的二硫键并非马上形成,而是要经过一些二硫键错接的中间物,蛋白质二硫键的形成速度则是由蛋白质的构象和分子内的巯基二硫键交换速度决定的。

在体外,二硫键形成速度是很慢的,即使是在最适条件下,达到反应平衡一半的时间也需要10—30min,这与非体内过程有关。因为体内过程是很快,二硫键通常在翻译中或翻译后马上就形成了。

一、蛋白质二硫键异构酶的发现

体外系统较慢地生成天然二硫键与体内天然二硫键的快速形成提示体内过程是一个酶促过程。1963年, Goldberger 等^[4]及 Venetianer 等^[5]几乎同时发现了在体外能催化还原的蛋白质形成天然二硫键,恢复其天然构象和活力的酶。并发现这个过程分两步进行:第一步是非酶促化学氧化形成二硫键错接的产物,第二步才是酶促二硫键的异构,以致形成天然的二硫键。由此,这个酶被命名为蛋白质二硫键异构酶(protein disulfide-isomerase, PDI, EC 5.3.4.1.),用使二硫键错接的核糖核酸酶活力的恢复来测活。这个酶首先由 Anfinsen 小组提取并做了部分性质研究。

二、蛋白质二硫键异构酶的细胞定位

人们发现,小心制备的鼠肝细胞微粒体组分是无异构酶活性的,但通过冻融或低渗处理,或快速沉淀后重新悬浮,都能使之有酶活性。用去污剂去除微粒体上的核糖体及表面的外周蛋白,处理后的微粒体仍能保留异构酶活性。对于完整的微粒体,异构酶也能够抵抗胰酶的水解而保留其潜在的活性。然而,异构酶制剂

或超声波处理过的微粒体组分却很容易被胰酶水解。用去污剂(如 Triton X-100)可很容易地使异构酶从破坏的微粒体膜上溶解下来。上述这些实验中,蛋白质二硫键异构酶与存在于微粒体腔内表面的标志酶:核苷酸二磷酸酶是非常相似的,而与存在于微粒体外膜和嵌入膜中的标志酶: NADPH: 细胞色素c 还原酶是截然不同的。所有这些事实表明,从微粒体外膜是不能接触到蛋白质二硫键异构酶的,异构酶与膜之间也不是很强的疏水结合。最可能的模型是异构酶很松散地结合在内质网膜的内腔表面上。其它作者对麦胚乳鸡胚腱的研究也发现蛋白质二硫键异构酶定位于内质网膜上^[6,7]。

三、蛋白质二硫键异构酶的物化性质及保守性

蛋白质二硫键异构酶含有较多的酸性氨基酸($\text{Asx} + \text{Glx} = 27\%$),等电点为4—4.5,很易溶于水,其最适 pH 为7.5—7.8。它是糖蛋白,含0.5—2%的碳水化合物。对肝脏异构酶的免疫分析及酶活分析表明,它在肝脏含量丰富,组成0.35—0.4%的总蛋白,1.5—2%的微粒体蛋白。不同种属间的异构酶还显示比较保守,人们已经从牛肝、鼠肝及鼠肾、鸡胚腱、麦胚乳等组织中得到了较纯的异构酶制品。所有这些异构酶都是由两个相同的亚基组成的二聚体,凝胶过滤测得分子量约为107000, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测得亚基分子量约为55000,沉降系数为3.5S。牛与鼠的异构酶的氨基酸组成及肽谱的研究表明,两者的一级结构非常相似。这些异构酶都定位于细胞的内质网膜上,鼠肝,鸡胚腱、麦胚乳来源的异构酶都能与牛肝的异构酶抗体起免疫反应,此外,它们都有相似的酶动力学常数^[6,7]。最近,从人胎盘中提纯的蛋白质二硫键异构酶也显示相似的性质^[8]。

四、蛋白质二硫键异构酶的分布、活力水平和蛋白质合成的关系

这个酶最初是在肝脏和胰脏中发现的,许多组织的研究结果表明,它主要存在于肝脏、胰

脏这类蛋白质合成较旺盛的组织中。鸡胚组织中的结缔组织的异构酶活力水平很高,这些组织涉及前胶原蛋白的合成,异构酶的含量与脯氨酰、赖氨酰羟化酶的含量也有很好的正比例关系,而后两种酶是参与前胶原蛋白翻译后加工的酶类。在淋巴组织中,异构酶的活力水平与免疫球蛋白的合成速度也有平行关系,免疫球蛋白合成得越旺盛,异构酶的活力水平就越高。在人成纤维细胞、鸡胚骨、麦胚乳等组织中,异构酶的活力水平与组织生长过程中含二硫键的蛋白质(如前胶原蛋白、贮存蛋白)的合成同样也有平行关系^[4]。

1987年, Roth等^[9]用交联剂对淋巴细胞组织进行了细胞内蛋白质二硫键异构酶与含二硫键的蛋白质的交联,分离到异构酶与免疫球蛋白交联的产物,很好地说明了蛋白质二硫键异构酶参与蛋白质生物合成。

植物中的蛋白质二硫键异构酶研究较少,仅对麦胚乳组织进行了一些有意义的研究。对微生物来源的异构酶研究就更少了。

五、蛋白质二硫键异构酶的 催化反应类型

蛋白质二硫键异构酶已经从许多哺乳动物中提纯,并用一系列的反应研究了它的催化性质。表1显示了在合适的条件下,蛋白质二硫键异构酶能够催化蛋白质天然二硫键的生成;二硫键的异构化和二硫键的还原。对于还原的蛋白质分子,在温和的氧化条件下(溶解的氧气,或氧化及还原的谷胱甘肽混合物),蛋白质二硫键异构酶能够催化天然二硫键的形成。这一过程分两步进行,首先是还原蛋白的氧化,然后是蛋白质二硫键异构酶催化的巯基二硫键交换反应;对于含有错接二硫键的氧化的蛋白质分子,在温和的还原条件下($10\mu\text{mol/L}$ DTT, 或 1mmol/L 还原型谷胱甘肽),蛋白质二硫键异构酶可以催化二硫键的异构,蛋白质二硫键异构酶的测活反应就利用了这一特性;对于氧化的蛋白质分子,在更强的还原条件下(10mmol/L 还原型谷胱甘肽),催化反应则成为使

蛋白质二硫键还原,蛋白质二硫键被过量的谷胱甘肽或其他简单的巯基试剂还原的研究已较多,而这一反应的催化剂曾经被命名为谷胱甘肽:胰岛素-转氢酶,或巯基蛋白质二硫键氧化还原酶。现在已认为它们与蛋白质二硫键异构酶是一种酶^[10,11]。所有这些催化反应,都可被看成是巯基二硫键的交换,最终的产物被认为是热力学稳定的产物。

近几年来,我们实验室用胰岛素及其衍生物对蛋白质二硫键异构酶的催化反应做了进一步的研究,首次报道了在中性条件下用异构酶使二硫键错接的多条肽链的分子,即二硫键错接的胰岛素以25—30%的产率生成了二硫键正确配对的天然胰岛素分子,并引入S-磺酸型的A,B链做间接底物也成功地得到了相同产率的天然分子。我们发现,低温不仅对于含两条肽链的胰岛素的二硫键正确配对是重要的,而且对于A,B链被交联剂交联的胰岛素(相当于一肽链)的二硫键的正确配对同样是重要的,这与低温有利于胰岛素A,B链间弱相互作用的发挥是相符的,而异构酶在低温条件下,仍可行使其催化功能。在相似的条件,我们从不同的底物出发,(二硫键错接的分子,S-磺酸型的分子,天然分子),可得到相似的平衡产物,提

表1 蛋白质二硫键异构酶催化反应举例^[4,12,13]

反应类型	例子
(1) 蛋白质天然二硫键的生成:	
(a) 生成链内二硫键	核糖核酸酶,溶菌酶,大豆胰凝乳蛋白酶,牛胰凝乳蛋白酶,牛血清白蛋白,交联胰岛素
(b) 生成链间二硫键	重链加轻链生成免疫球蛋白,前 α -链生成I型前胶原蛋白,胰岛素A,B链生成胰岛素
(2) 蛋白质二硫键的异构:	
(a) 使从其前体来的含多条肽链的蛋白质分子失活	核糖核酸酶水解片段,胰凝乳蛋白酶,胰岛素
(b) 使二硫键错接的蛋白质生成天然蛋白质	核糖核酸酶,溶菌酶,大豆胰凝乳蛋白酶,胰岛素原,胰岛素,交联胰岛素
(3) 蛋白质二硫键的还原	胰岛素及其衍生物,蓖麻蛋白及其他植物毒素,催产素及加压素

示我们借助异构酶找到了分子在此条件下的热力学平衡状态,为研究含二硫键的蛋白质分子在一定条件下的相对稳定性提供了实例^[12,13]。

由表1可见蛋白质二硫键异构酶催化反应的最显著的方面是它具有广泛的底物特异性,这是与其参与蛋白质的生物合成的功能相符的。

六、蛋白质二硫键异构酶的催化机理

Creighton等^[14]用蛋白质二硫键异构酶对牛胰酶抑制剂在形成天然二硫键过程中,特殊的中间产物的形成及消失的时间过程进行了研究,给出了异构酶催化反应的细节。在这个过程中,异构酶的确显示了酶的性质,在较底物低得多的浓度下就能起作用,加快反应速度而不改变非酶促条件下的反应途径,催化包括底物的构象变化及巯基二硫键交换这样的限速步骤。由此可见,异构酶的催化机理与它参与蛋白质生物合成中天然二硫键的形成的性质非常吻合。

七、蛋白质二硫键异构酶的活性部位

用蛋白质化学修饰的方法对蛋白质二硫键异构酶活性部位的研究,已经积累了充足的理由说明蛋白质二硫键异构酶的活性部位含有双巯基。氧化态的酶是没有活性的,必需在有少量巯基存在下才有活性。1985年,Edman等通过重组DNA技术,已经得到了鼠肝蛋白质二硫键异构酶的一级结构,可见其在一个亚基中含有两个非常相似的结构域^[15],这两个结构域都含有Trp-Cys-Gly-His-Cys-Lys肽段,其中Cys-35、Cys-379被认为是活性部位巯基^[16]。

八、蛋白质二硫键异构酶可能具有多功能

近年来人们发现,蛋白质二硫键异构酶与脯氨酰-4-羟化酶的 β -亚基的氨基酸序列非常相似,其氨基酸水平同源性为94%,核酸水平同源性为84%^[17]。分离的 β -亚基具有蛋白质

二硫键异构酶的活力,即使在脯氨酰-4-羟化酶($\alpha_2\beta_2$)中, β -亚基仍显示蛋白质二硫键异构酶一半的活力^[18]。人们还发现,蛋白质二硫键异构酶的氨基酸序列还与三碘甲腺原氨酸结合蛋白非常相似,在氨基酸水平有93%的同源性^[19]。此外,Geetha-Habib等发现蛋白质二硫键异构酶还与糖基化部位结合蛋白在氨基酸水平有90%的同源性,异构酶能与糖基化部位结合蛋白的光亲和标记物结合,且三碘甲腺原氨酸的结合蛋白的抗体能与糖基化部位结合蛋白特异结合^[20]。脯氨酰-4-羟化酶是参与蛋白质生物合成的酶,也是内质网膜上的标志酶;糖基化部位结合蛋白是寡聚糖转移酶的组成部分,后者是参与蛋白质后加上的酶类;而三碘甲腺原氨酸则是细胞生长代谢的调节因子,其结合蛋白是非常可能与蛋白质生物合成有关的。异构酶是多功能的蛋白,还是进化中的特异蛋白?笔者认为后者的可能性为大,对于以上四个蛋白,除异构酶与脯氨酰-4-羟化酶的 β -亚基有明确的相关生物活力外,其它尚无充分的依据,Geetha-Habib等的实验尚难以说明问题,我们实验室对三碘甲腺原氨酸与异构酶的结合实验给出的也是负结果(未发表)。

九、蛋白质二硫键异构酶生物功能尚无定论

蛋白质二硫键异构酶与脯氨酰-4-羟化酶的 β -亚基,三碘甲腺原氨酸结合蛋白与糖基化部位结合蛋白的高度同源性,使得蛋白质二硫键异构酶的生物功能更加复杂化。加上蛋白质二硫键异构酶体外催化效率较低;反应需酶量较大;还原蛋白质在体外没有蛋白质二硫键异构酶的条件下同样可以一定产率生成天然分子,使得蛋白质二硫键异构酶的生物功能尚无定论,但许多事实表明它非常可能参与蛋白质的生物合成。

总之,蛋白质二硫键异构酶是一种含量丰富比较保守的蛋白质,其催化性质、组织分布、亚细胞位置,及随细胞生长不同阶段而变化的

(下转第181页)

但是对贮藏蛋白基因表达的研究尚处于起始阶段,对许多贮藏蛋白基因的结构,以及基因表达的调控机理仍不清楚。应用转化实验研究贮藏蛋白基因在发育过程中特异性表达的有关顺序,把关于控制植物基因表达过程的理论同把基因引入植物细胞并产生可遗传的变异的植物的技能结合起来,必定会在不久的将来为培养和选择具有高质量和数量的贮藏蛋白的植物开辟美好的前景。

参 考 文 献

- 1 李向辉等编著. 植物遗传操作技术. 北京: 科学出版社, 1988; 105
- 2 Goldberg R B, Hoschek G, Ditta G S *et al.* *Developmental Biology*, 1981; 83: 218
- 3 Sánchez-Martínez D, Puigdomènech P, Pagés M. *Plants Physiol*, 1986; 82: 543.
- 4 Ueng P, Galili G, Sapanra V *et al.* *Plants Physiol*, 1988; 86: 1281
- 5 缪国华, 唐锡华. 植物生理学报, 1985; 11(4): 336
- 6 Fischer R L, Goldberg R B. *Cell*, 1982; 29: 65.
- 7 Kublemeier C, Green P J, Chua N H. *Ann Rev Plant*

- Physiol*, 1987; 38: 221
- 8 Heidecker G, Messing J. *Ann Rev Plant Physiol*, 1986; 37: 439
- 9 Hu N-T, Peifer M A, Heidecker G *et al.* *EMBO J*, 1982; 1: 1337
- 10 Messing J, Geraghty D, Heidecker G *et al.* In: Kesuge T, Meredith CP, Hollander A eds, *Genetic engineering of plants*, New York: Plenum, 1983; 211
- 11 Pedersen K, Devereux J, Wilson DR *et al.* *Cell*, 1982; 29: 1015
- 12 Moreira M A, Hermodson M A, Larkins B A, *et al.* *The Journal of Biological Chemistry*, 1979; 254: 9921
- 13 Schuler M A, Schmitt E S, Beachy R N, *Nucleic Acids Res*, 1982; 10: 8225
- 14 赵文明. 生命与化学, 1986; 6(4): 32
- 15 Hyldig-Nielsen J J, Jensen E O, Wiborg O *et al.* *Nucleic Acid Res*, 1982; 10: 689
- 16 Zeevaart J A D, Creelman R A. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1988; 39: 439
- 17 Goday A, Sánchez-Martínez D, Gomez J *et al.* *Plants Physiol*, 1988; 88: 564
- 18 Bray E A, Beachy P N. *Plants Physiol*, 1985; 79: 746
- 19 Chen C-M, Leisner S M. *Plants Physiol*, 1985; 77: 99
- 20 Gayler K R, Sykes G E. *Plants Physiol*, 1985; 78: 582
- 21 Holowach L P, Madison J T, Thompson J F. *Plants Physiol*, 1986; 80: 561

[本文于1990年4月16日收到, 6月12日修回]

(上接第 176 页)

活力水平的性质,是与它在体内可能参与蛋白质生物合成,催化巯基二硫键交换,形成天然二硫键的功能相一致的。

参 考 文 献

- 1 Epstein C J, Goldberger R F, Anfinsen C B. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 1963; 28: 439
- 2 Wetlaufer D B, Ristow S S. *Annu Rev Biochem*, 1973; 42: 135
- 3 Creighton T E. *Prog Biophys Mol Biol*, 1978; 33: 231
- 4 Goldberger R F, Epstein C J, Anfinsen C B. *J Biol Chem*, 1963; 238: 628
- 5 Venetainer P, Straub F B. *Biochim Biophys Acta*, 1963; 67: 166
- 6 Freedman R B, Brockway B E, Lambert N. *Biochem Soc Trans*, 1984; 12: 929
- 7 Morin J E, Dixon J E. *Meth in Enzymol*, 1984; 113: 541
- 8 Kaetzel C S, Rao C K, Lamm M E. *Biochem J*, 1987;

- 241: 39
- 9 Roth R A, Pierce S B. *Biochemistry*, 1987; 26: 4179
- 10 Bjelland S, Wallevik K, Kroll J *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1983; 747: 197
- 11 Lambert N, Freedman R B. *Biochem J*, 1983; 213: 235
- 12 Tang J G, Wang C C, Tsou C L. *Biochem J*, 1988; 255: 451
- 13 Tang J G, Tsou C L. *Biochem J*, 1990; 268: 429
- 14 Creighton T E, Hillson D A, Freedman R B. *J Mol Biol*, 1980; 142: 43
- 15 Edman J C, Ellis L, Blacher R W *et al.* *Nature*, 1985; 317: 267
- 16 Hawkins H C, Forster S J, Murant S J *et al.* *Biochem Soc Trans*, 1986; 14: 756
- 17 Pihlajaniemi T, Heleakoski T, Tasanen K *et al.* *The EMBO J*, 1987; 6: 643
- 18 Koivu J, Myllyla R, Kivirikko K I. *Biochem J*, 1987; 237: 237
- 19 Yamauchi K, Yamamoto, T, Hayashi H *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1987; 146: 1485
- 20 Geetha-Habib M, Noiva R, Kaplan H A *et al.* *Cell*, 1988; 54: 1053

[本文于1990年2月20日收到, 6月15日修回]